



PCT/FR 2004/003042

REC'D 07 FEB 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

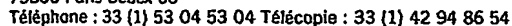
DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

INPI



cerfa
N° 11354*03

BR1

DB 540 e V / 210502

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES RECHERCHES DATE 26 NOV 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0313858 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		VIALLE-PRESLES	
Prénom		Marie José	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36, rue de Saint-Petersbourg	
	Code postal et ville	[7 5 10 10 18] PARIS	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [] [] [] [] []	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	
VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)			

La présente invention est relative à l'utilisation de la L-isoaspartyl méthyltransférase comme marqueur du vieillissement de lots de semences.

Le vieillissement des semences, qui intervient au cours de leur stockage, s'accompagne de la détérioration des membranes cellulaires, de la
5 modification de l'activité catalytique de nombreuses enzymes (pour revue cf. WALTERS C., 1998; *Seed Sci. Res.*, 8: 223-244), et de l'accumulation de mutations de l'ADN. L'ensemble de ces phénomènes entraîne une diminution de la vigueur germinative et de la viabilité des semences.

La rapidité du vieillissement dépend d'un ensemble complexe de
10 facteurs intrinsèques (notamment facteurs génétiques) et extrinsèques (conditions de conservation). Comme le degré de vieillissement conditionne la qualité germinative des semences, ainsi que leur aptitude à une conservation ultérieure, il est souhaitable de pouvoir le déterminer le plus rapidement et le plus précisément possible.

Les tests actuellement disponibles pour évaluer la qualité
15 germinative d'un lot de semences sont principalement des tests basés sur des essais de germination prenant en compte différents paramètres, tels que le délai moyen de germination du lot, l'étalement de la germination dans le temps, la capacité germinative, et la fréquence de plantules normales. La faculté germinative est par exemple définie par le pourcentage de plantules normales ayant germées, au bout d'un
20 nombre de jours donné après le semis, pondéré par le pourcentage de très jeunes pousses. Ces tests sont définis et calibrés pour chaque espèce ou variété par un organisme de certification des semences selon les normes ISTA (International Seed Testing Association). Cependant, ces essais sont lourds à mettre en oeuvre. D'autre part ils permettent d'évaluer la qualité germinative actuelle d'un lot de semences, mais
25 pas de prédire son évolution future, et notamment ne permettent en aucun cas d'anticiper une chute de vigueur germinative.

On ne dispose pas à l'heure actuelle, de marqueurs spécifiques permettant de prédire simplement et avec précision la viabilité d'un lot de semences, et *a fortiori* sa capacité de conservation.

30 Parmi les multiples enzymes dont l'activité apparaît modifiée au cours du vieillissement (cf. WALTERS C, 1998, *Seed Sci. Res.*, 8: 223-24 4 précité), les Inventeurs se sont plus particulièrement intéressés à la L-isoaspartyl méthyltransférase (IAMT).

35 La L-isoaspartyl méthyltransférase (EC 2.1.1.77) est une enzyme de réparation protéique qui intervient dans la conversion de résidus anormaux L-isoaspartate et D-aspartate présents dans les protéines, en résidus L-aspartate.

Les résidus L-isoaspartate et D-aspartate qui constituent le substrat de la L-isoaspartyl méthyltransférase résultent de la déamidation, de l'isomérisation et de la racémisation spontanées de résidus aspartate et asparagine, qui interviennent au cours du vieillissement des graines, et qui font partie des modifications pouvant affecter la fonctionnalité des protéines dans lesquelles ces résidus sont intégrés.

La L-isoaspartyl méthyltransférase permet de convertir au moins une partie de ces résidus en résidus L-aspartate, permettant aux protéines ainsi réparées de retrouver leur activité.

La L-isoaspartyl méthyltransférase est une enzyme cytosolique quasi universelle, que l'on retrouve dans de très nombreux organismes, depuis les bactéries (à gram négatif), jusqu'aux plantes et animaux (O'CONNER C.M *et al*, 1985; *Biochem. Biophys. Res.*, 132: 1144-1150).

Chez les plantes, l'activité L-isoaspartyl méthyltransférase apparaît présente dans la quasi-totalité des espèces végétales ; l'activité L-isoaspartyl méthyltransférase a notamment été mise en évidence dans le germe de blé (TRIVEDI L. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1982, 128: 349-354, MUDGETT M.B. *et al*, *Biochemistry*, 1993, 32: 11100-11111, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269(41): 25605-25612) puis chez le lotus. (SHEN-MILLER *et al.*, *Am. J. Bot.*, 1995, 82(11): 1367-1380), *Arabidopsis thaliana* (MUDGETT M.B. *et al*, *Plant. Mol. Biol.*, 1996, 30: 723-737 ; THAPAR N. *et al*, *Protein Expr. Purif.*, 2000, 20: 237-251), l'orge (MUDGETT M.B. *et al.*, *Plant Physiol.*, 1997, 115: 1481-1489), la tomate (KESTER *et al.*, *J. Exp. Bot.*, 1997, 309: 943-949), le maïs, la carotte et le riz (THAPAR N. *et al.*, *Plant Physiol.*, 2001, 125(2): 1023-1035).

Cette activité est détectable dans de nombreux organes chez les plantes, mais elle apparaît maximale dans les graines sèches (MUDGETT M.B. *et al.*, *Plant. Mol. Biol.*, 1996, 30: 723-737). CLARKE S. (*Int. J. Pept. Protein Res.*, 1987, 30: 808-821) a montré *in vitro* que la IAMT a une activité de réparation d'environ 30% des résidus anormaux ; son bon fonctionnement permet donc à la graine ou à la plante de ralentir la perte d'intégrité des protéines accumulant des acides aminés L-isoaspartate, mais pas de compenser en totalité les phénomènes de racémisation et d'isomérisation. SHEN-MILLER *et al.* (*Am. J. Bot.*, 1995, 82(11): 1367-1380) ont dosé l'activité IAMT dans des graines de Lotus Sacré (*Nelumbo nucifera*) âgées d'environ 90 ans. Les graines qui se sont révélées capables de germer possédaient une activité IAMT élevée et le taux de résidus racémisés était équivalent à celui de graines fraîches, soit 2%. KESTER *et al.*, (*J. Exp. Bot.*, 1997, 309: 943-949) ont rapporté, chez des graines de tomates vieilles artificiellement, une diminution de l'activité

IAMT corrélée à une baisse de la capacité germinative. MUDGETT M.B. *et al.*, (*Plant Physiol.*, 1997, 115: 1481-1489), ont également observé, sur des graines d'orge vieilles naturellement, que l'activité L-isoaspartyl méthyltransférase diminuait en fonction de l'âge des semences et que cette diminution s'accompagnait de l'accumulation de résidus L-isoaspartyl racémisés ainsi que d'une perte de viabilité des semences ; en revanche, dans le cas des graines d'orge vieilles artificiellement, ils ont aussi observé une accumulation de résidus racémisés et une diminution de la capacité germinative, mais pas de baisse de l'activité IAMT.

Ces travaux suggèrent que la L-isoaspartyl méthyltransférase pourrait jouer un rôle dans la protection des graines contre le vieillissement. Cependant, ils ne permettent pas de conclure à l'existence d'une corrélation directe entre la quantité de L-isoaspartyl méthyltransférase et la capacité germinative des graines, qui permettrait d'utiliser cette enzyme comme marqueur de la capacité germinative.

En outre, les résultats décrits dans les travaux mentionnés ci-dessus s'appuient soit sur des tests d'activité IAMT, soit sur la détection de l'ARNm de la L-isoaspartyl méthyltransférase.

Or, le dosage de l'activité enzymatique fait appel à des méthodes lourdes et nécessitant l'utilisation de méthanol radioactif, qui sont difficiles à mettre en œuvre dans le cadre de contrôle de routine. D'autre part, en ce qui concerne l'ARNm, il a été observé qu'il n'y avait pas toujours de corrélation entre la détection de transcrits de l'IAMT et l'activité enzymatique IAMT. Ainsi, MUDGETT M.B. *et al* (*Plant. Mol. Biol.*, 1996, 30: 723-737) ont rapporté que chez *Arabidopsis thaliana*, l'ARNm de l'IAMT était détectable dans les plantules (où l'activité enzymatique n'est pas détectable) mais pas dans la graine sèche (où l'activité enzymatique est maximale).

Les Inventeurs sont parvenus à identifier des mutants de régulation de la L-isoaspartyl méthyltransférase chez *Arabidopsis thaliana* et ont ainsi pu constater que son expression est responsable d'une meilleure capacité de conservation de la graine sèche au cours du stockage. Ils ont en outre identifié des épitopes de cette protéine permettant d'obtenir des anticorps capables de reconnaître non seulement la L-isoaspartyl méthyltransférase d'*Arabidopsis thaliana* mais également ses orthologues chez d'autres espèces végétales, dicotylédones ou monocotylédones.

Le dosage de la L-isoaspartyl méthyltransférase à l'aide de ces anticorps a permis d'établir une corrélation entre la disparition de la protéine dans la graine sèche et la perte de vigueur germinative. En outre, les Inventeurs ont observé

que la diminution de la quantité de L-isoaspartyl méthyltransférase précède la baisse de vigueur germinative. Il apparaît donc que cette enzyme constitue un marqueur prédictif, qui permet non seulement d'évaluer la capacité germinative des semences, mais également de prédire une baisse de cette capacité au cours de la conservation.

5 La présente invention a pour objet un procédé de détermination de la vigueur germinative et/ou de l'aptitude d'un lot de semences à la conservation, caractérisé en ce qu'il comprend la quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase, sur un échantillon de semences prélevé sur ledit lot.

10 Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, la quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase est effectuée à l'aide d'un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase.

La présente invention a aussi pour objet un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide constitué par tout ou partie de la portion de ladite enzyme définie par la séquence peptidique (I) suivante :

15 QX₁LX₂VX₃DKX₄X₅DGSX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂SVRYVPLTSRX₁₃X₁₄QLX₁₅X₁₆X₁₇
(SEQ ID NO :1), dans laquelle X₁ représente D ou E, X₂ représente Q ou K, X₃ représente V ou I, X₄ représente N ou S, X₅ représente S, E, ou A, X₆ représente soit un dipeptide choisi parmi VS, VT, et TS, soit une liaison peptidique, X₇ représente I
20 ou V, X₈ représente K, Q ou R, X₉ représente D, V ou N, X₁₀ représente soit le dipeptide HT, soit une liaison peptidique, X₁₁ représente E ou D, X₁₂ représente T ou A, X₁₃ représente E, V ou S, X₁₄ représente A ou E, X₁₅ représente R, G ou Q, X₁₆ représente G ou D, X₁₇ représente D ou F.
Q, D, G, S, V, R, Y, V, P, L, T, S, R, K, I, E, A, N, H, F ont ici leur signification
25 usuelle en code 1 lettre.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit anticorps est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant l'immunisation d'un animal avec un fragment de L-isoaspartyl méthyltransférase comprenant la séquence (I).

30 Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit peptide a une taille de 10 à 20 acides aminés, avantageusement de 13 à 18 acides aminés.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, ledit peptide est choisi parmi :

35 - un peptide de séquence (II) : QX₁LX₂VX₃DKX₄X₅DGSX₆X₇X₈
(SEQ ID NO :2)

dans laquelle $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7$ et X_8 sont tels que définis ci-dessus ;

- un peptide de séquence (III) : RYVPLTSRX₁₃X₁₄QLX₁₅ (SEQ ID NO :3)

5 dans laquelle X_{13}, X_{14} et X_{15} , sont tels que définis ci-dessus.

De manière particulièrement avantageuse, ledit peptide est choisi parmi :

- un peptide de séquence QDLQVVDKNSDGSVSIK (SEQ ID NO :4);

10 - un peptide de séquence RYVPLTSREAQLR (SEQ ID NO :5).

La présente invention a également pour objet un procédé de quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase dans du matériel végétal, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit matériel avec un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase conforme à l'invention.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase conforme à l'invention pour déterminer la vigueur germinative et/ou l'aptitude à la conservation d'un lot de semences.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples décrivant la mise en
20 évidence de la corrélation entre la quantité de L-isoaspartyl méthyltransférase et l'aptitude des graines à la conservation, ainsi que l'obtention d'un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase et son utilisation pour évaluer la qualité germinative de semences de différentes espèces.

25 **EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION D'UN MUTANT DE REGULATION DE LA L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***

Le criblage de la collection de transformants ADN-T d'*Arabidopsis thaliana* de l'INRA de Versailles, a permis d'isoler un mutant d'insertion au niveau du gène de l'*IAMT*. Ce mutant a été dénommé *atpcm1.1*. Les données de séquençage
30 montrent que l'insertion ADN-T est localisée à 173 paires de bases en amont de l'ATG, dans la région promotrice du gène de la L-isoaspartyl méthyltransférase, où elle a causé une délétion de 13 paires de bases, faisant disparaître une boîte de réponse à l'acide abscissique (boîte ABRE pour Abscissic acid-Response Element).

Des plantes mutantes homozygotes pour l'insertion de l'ADN-T ont
35 été sélectionnées pour l'étude des propriétés du mutant.

Expression du gène *IAMT* chez le mutant *atpcm1.1*

L'expression du gène *IAMT* dans les plantules et dans les graines sèches chez le mutant *atpcm1.1*, et chez la plante sauvage a été comparée par RT-PCR semi-quantitative. A titre de contrôle on utilise le gène du facteur de transcription EF qui présente un profil d'expression constitutif au cours du développement chez la graine d'*Arabidopsis thaliana*.

Les plantules sont obtenues par semis de graines sur un filtre de nylon (BUISINE, NYCOM, mailles de 5µm de diamètre) reposant sur un milieu eau gélosée 0.5%. Après stratification (4°C, 2 jours), les boîtes sont déposées en chambre de culture pendant 4 jours. Les filtres sur lesquels sont disposées les plantules, sont ensuite transférés sur un milieu eau gélosée pendant un jour, avant que les ARN soient extraits.

Les ARN totaux sont extraits des plantules ou des graines sèches selon la technique au phénol chaud de VERWOERD *et al.* (*Nucleic Acids Res.*, 1989, 17(6): 2362), modifiée par l'ajout d'une seconde précipitation au LiCl (2 M final) de 6 heures. La purification des poly(A)⁺ est réalisée à partir des ARN totaux à l'aide d'oligo(dT)₂₅ fixés à des billes magnétiques s Dynabeads® (DYNAL).

Le premier brin d'ADNc est synthétisé par rétrotranscription (RT) des ARNm poly(A)⁺.
L'amplification par PCR est réalisée sur 10 ng du produit de RT.

On utilise pour le gène de la L-isoaspartyl méthyltransférase, l'un des couples d'amorces suivants :

AMEAs:

GCT ATG GAG GCT GTG GAT AGA GG (SEQ ID NO :6)

AQLRa :

TCA GTC CCC TCT CAG CTG CGC (SEQ ID NO :7)

ou

GTGYs :

GGA CCG GGT ACT TAA CTG CTT (SEQ ID NO :8)

AQLRa

et pour le gène du facteur d'élongation EFα, le couple d'amorces suivant :

F1αA4-low :

TTG GCG GCA CCC TTA GCT GGA TCA (SEQ ID NO :9)

F1αA4-up:

ATG CCC CAG GAC ATC GTG ATT TCA T (SEQ ID NO :10)

La PCR est arrêtée à 15, 18 ou 21 cycles afin d'anticiper le moment où l'amplification n'est plus linéaire, donc plus interprétable en termes de quantités initiales.

Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose (0.8%) puis transférés, en milieu alcalin (soude 0,4 N) sur membrane de nylon, et cette dernière est hybridée avec une sonde radiomarquée spécifique du gène *IAMT* (sonde IAMT) ou avec une sonde radiomarquée spécifique du gène *EF*.

La quantification du signal d'hybridation est effectuée avec le logiciel MacBas®.

10 Résultats obtenus dans les plantules de 5 jours :

Ces résultats sont illustrés par la Figure 1.

Légende de la Figure 1 :

(A) Gel d'électrophorèse ;

(B) Autoradiographie après hybridation avec la sonde ;

15 (C) Quantification des signaux ;

WT : plantules sauvages ; *Atpcm* : plantules du mutant *atpcm1.1*

a : 15 cycles de PCR ; b : 18 cycles de PCR ; c : 21 cycles de PCR

Ces résultats montrent que le gène s'exprime 1.5 fois plus chez le sauvage que chez le mutant.

20 Cette expérimentation a également été effectuée à partir de plantules qui, après un passage de 4 jours en chambre de culture ont été transférées sur un milieu eau gélosée contenant 100 μ M d'acide abscissique, pendant un jour avant l'extraction des ARN.

Les résultats sont illustrés par la Figure 2 :

25 Légende de la Figure 2 :

(A) Autoradiographie après hybridation avec la sonde ;

(B) Quantification des signaux ;

WT : plantules sauvages ; *Atpcm* : plantules du mutant *atpcm1.1*

a : 15 cycles de PCR ; b : 18 cycles de PCR ; c : 21 cycles de PCR

30 Ces résultats montrent que les plantules sauvages surexpriment le gène *IAMT* en présence d'ABA, ce qui confirme les observations précédemment effectuées par MUDGETT M.B. *et al* (*Plant. Mol. Biol.*, 1996, 30: 723-737, précité), et qu'elles accumulent 3 fois plus de transcrits IAMT que les plantules *atpcm1.1*. Le mutant *atpcm1.1* a visiblement perdu sa capacité d'induire l'expression de l'IAMT en présence d'ABA dans les plantules. Cette donnée permet de confirmer que la région

35

délétée par la mutation contient bien une séquence régulatrice (boîte ABRE) impliquée dans la réponse à l'ABA

Résultats obtenus dans les graines sèches :

Les résultats sont illustrés par la Figure 3 :

5 Légende de la Figure 3 :

(A) Autoradiographie après hybridation avec la sonde;

(B) Quantification des signaux ;

WT : graines sauvages ; *Atpcm1.1* : graines du mutant *atpcm1.1*

a : 15 cycles de PCR ; b : 18 cycles de PCR ; c : 21 cycles de PCR.

10 On n'observe aucune accumulation des transcrits IAMT dans les graines sèches de la plante sauvage, ce qui confirme les observations précédemment effectuées par MUDGETT M.B. *et al* (*Plant. Mol. Biol.*, 1996, 30: 723-737, précité). En revanche, le mutant *atpcm1.1* accumule le transcrit IAMT à un niveau non négligeable dans la graine sèche.

15 **EXEMPLE 2 : INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT ACCELERE SUR LA VIGUEUR GERMINATIVE DES GRAINES D'ARABIDOPSIS THALIANA DE TYPE SAUVAGE, OU DU MUTANT *ATPCM1.1*-**

Des expérimentations de vieillissement accéléré ont été effectuées sur des graines fraîchement récoltées afin de tester s'il existe une différence de
20 viabilité entre le type sauvage et le mutant *atpcm1.1*.

Le vieillissement accéléré est réalisé à 40° (étuve Jouan) et 48% HR (obtenu avec le sel $Mg(NO_3)_2$ saturé) (bocal hermétique et graines dans sachets en papier filtre stériles). La température et l'humidité sont contrôlées avec Testostor 175 (Testo).

25 Des échantillons sont prélevés au bout de 2, 6 et 9 semaines de vieillissement et un test de germination est effectué sur 200 graines.

La germination se fait en boîte de Pétri (diamètre 55 mm) sur milieu aqueux additionné de MES (acide 2-N-Morpholino Ethane Sulfonique) à 0,58 g/l, ajusté à pH 5,9, et solidifié par l'agar (7g/l). Le semis est effectué sous hotte à flux
30 laminaire, à raison de 25 graines par boîte, disposées régulièrement sur le milieu pour mieux repérer le début de la germination. Les graines semées sont observées quotidiennement à la loupe. Une graine est considérée comme germée lorsque la radicule est visible à la loupe.

35 Chaque essai comprend 8 répétitions de 25 graines et les moyennes des pourcentages de graines germées après 3 jours d'imbibition sont reportées sur le graphe. Une graine est dite germée lorsque la radicule est visible.

La germination se fait en boîte de Pétri (diamètre 55mm), à raison de 25 graines par boîte, sur milieu aqueux solide (agar 7g/l) complété avec 0,58 g/l de MES (acide 2-N-Morpholino Ethane Sulfonique) et ajusté à pH 5,9.

Ce test est effectué dans différentes conditions de température: (1) une alternance de températures 20-25°C, qui correspond aux conditions optimales pour la germination et permet de mesurer la viabilité des semences; (2) une température de 15°C, et une température de 27°C, qui sont légèrement pénalisantes pour la germination; une baisse de la capacité germinative dans ces conditions reflète une baisse de vigueur germinative du lot de semences.

Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

Légende de la Figure 4 : Capacité germinative 3 jours après semis, à 20-25°C (A), 15°C (B), et à 27°C (C), en fonction de la durée de stockage.

◆ : graines sauvages ;

■ : graines du mutant *atpcml.1*

La cinétique de germination effectuée avec une alternance de température 20-25°C (Figure 4 A) ne montre pas de différences significatives dans la capacité de germination des graines du mutant et du type sauvage. En revanche, lorsque les graines sont imbibées à 15 et 27°C (Figures 4 B et C), qui sont des températures pénalisantes pour la germination d'*Arabidopsis thaliana* et où des différences de vigueur germinatives peuvent être mises en évidence, il apparaît que la vigueur germinative des graines de type mutant, à partir de 6 semaines de vieillissement accéléré, est supérieure à celle des graines de type sauvage d'environ 30%.

EXEMPLE 3 : PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-IAMT.

2 peptides de la région C-terminale de l'isoaspartyl méthyltransférase d'*Arabidopsis thaliana* : QDLQVVDKNSDGSVSIK (SEQ ID NO :4 ; peptide 1), et : RYVPLTSREAQLR (SEQ ID NO :5 ; peptide 2) ont été choisis comme immunogènes.

Les anticorps ont été préparés chez le lapin selon le protocole suivant:

Après prélèvement de 1,5 ml de sérum « pré-immun », L'immunisation des lapins est effectuée par une première injection du peptide choisi (4 mg en solution dans 200.µg de peptide dans 5 ml d'une solution contenant la protéine porteuse KLH mélangé à 5 ml de l'adjuvant de Freund's, suivie d'injections de rappel 1, 2, 4, 8 et 15 semaines après la 1^{ère} injection. Le sérum immun (50ml) est prélevé 20 semaines après la 1^{ère} injection.

Les anticorps sont purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne de SEPHAROSE 4F (PHARMACIA) activé au bromure de cyanogène, greffée avec 20 mg du peptide par gramme de gel Sépharosé utilisé comme immunogène.

5 5 ml de sérum préalablement dilué dans 5 ml de PBS 1x (NaC-140-mM ; KCl 2,5 mM ; Na_2HPO_4 8,1 mM ; KH_2PO_4 15 mM ; pH 7,2) sont appliqués sur la colonne.

Le gel est lavé 3 fois par 10.ml de PBS 1x. L'élution est effectuée par passage de 10.ml d'une solution 0,2 M glycine/0,15 M NaCl pH2. Les fractions
10 éluées sont collectées dans des tubes contenant 01ml de Tris pH 8,8 (1,5 M)

Les fractions contenant l'anticorps sont rassemblées, (dialysées contre une solution de PBS 1x froid), puis complétées avec 0,02% d'azide de sodium. Les fractions sont conservées à 4°C.

15 **EXEMPLE 4 : DETERMINATION PAR TRANSFERT DE WESTERN DE LA TENEUR EN PROTEINE IAMT DANS LES GRAINES SECHES D'A. THALIANA, ET DE SON EVOLUTION AU COURS DU VIELLISSEMENT.**

Les anticorps anti-IAMT générés, comme décrit à l'Exemple 3 ci-dessus, contre le peptide I (anticorps 1) ont été utilisés pour déterminer la teneur en L-isoaspartyl méthyltransférase de graines sèches d'*Arabidopsis thaliana* de type
20 sauvage et de type mutant fraîchement récoltées ou vieilles pendant 2, 6 et 9 semaines comme décrit à l'Exemple 2 ci-dessus.

Extraction des protéines des graines :

Les graines sont broyées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. La poudre est transférée au tiers d'un tube EPPENDORF de 2 ml
25 complété avec du tampon de LAEMMLI 2X (LAEMMLI U.K., *Nature*, 1970, 227: 680) préalablement chauffé à 100°C. Les échantillons sont incubés à 100°C durant 5 minutes avant d'être centrifugés à 4°C (6000g, 5 minutes). Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -20°C. Préalablement à l'utilisation, 100 µl de surnageant sont
30 précipités dans un volume équivalent d'acide trichloracétique à 20% (13000 rpm, 5 minutes). Le culot est lavé avec 200 µl d'acétone 80%, séché et repris dans 1 ml de soude 0.2N. La concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 595 nm du complexe protéine-réactif de Bradford (Bio-Rad). La sérum albumine bovine est utilisée pour obtenir une courbe étalon.

Transfert de Western :

L'électrophorèse des protéines (10 µg) est conduite en conditions dénaturantes (SDS 0.1%) sur un gel de polyacrylamide (12%) conformément à LAEMMLI (*Nature*, 1970, 227: 680). Le transfert semi-sec est effectué sur une membrane de nylon de type HYBOND C (AMERSHAM) sous un courant de 20V pendant 50 minutes. La membrane est ensuite incubée 40 minutes dans une solution de PBS-T (NaCl, 1,4 M ; KCl, 27 mM; Na₂HPO₄, 81 mM; KH₂PO₄, 150 mM ; Tween® 20, 0,001%) à laquelle est ajouté du lait en poudre (5%) afin de saturer les sites non spécifiques.

L'anticorps primaire anti-IAMT est ajouté (dilution 1/5000^{ème}) et l'incubation est réalisée pendant la nuit à 4°C sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes avec du PBS-Tween, la membrane est incubée avec du PBS-Tween® + lait additionné de l'anticorps secondaire anti-Ig G de lapin couplé à la peroxydase (Bio-Rad), durant 2 heures à température ambiante sous agitation. La membrane est à nouveau lavée 2 fois avec du PBS-Tween. La révélation est effectuée par chimioluminescence, en utilisant le kit COVALIGHT, dans les conditions préconisées par le fabricant (CovalAb). Après 1 minute, la membrane est transférée sous un film autoradiographique et exposée 30 minutes.

Les résultats sont illustrés par la Figure 5.

Légende de la Figure 5 : graines d'*Arabidopsis thaliana* sauvage (WT) ; graines du mutant *atpcml.1* (MT) ; 2, 6, ou 9 en indice : graines vieilles 2, 6 ou 9 semaines.

Dans tous les cas, une seule bande est observée. La protéine reconnue correspond à la taille attendue pour l'enzyme IAMT, ce qui montre la spécificité de l'anticorps 1 pour cette enzyme dans la graine sèche.

On observe chez les graines de type sauvage, une diminution de la quantité de protéine L-isoaspartyl méthyltransférase, qui se manifeste dès 2 semaines de vieillissement accéléré, et qui se poursuit jusqu'à la fin de l'expérimentation. Au contraire, dans les graines du mutant *atpcml.1* on observe une augmentation de la quantité d'enzyme au cours du vieillissement.

Cette observation corrobore les résultats rapportés à l'Exemple 1, montrant l'accumulation du transcrit IAMT dans les graines sèches du mutant *atpcml.1*, et peut être corrélée avec la meilleure vigueur germinative du mutant *atpcml.1* après vieillissement accéléré rapportée à l'Exemple 2.

Ces données indiquent que la protéine L-isoaspartyl méthyltransférase constitue un marqueur intéressant de l'évolution de la vigueur germinative d'un lot de semences au cours du stockage.

EXEMPLE 5 : UTILISATION DE L'ANTICORPS ANTI-IAMT POUR DETERMINER DE L'APTITUDE A LA CONSERVATION DE SEMENCES DE MAÏS ET DE HARICOT.

Des expérimentations complémentaires ont été effectuées afin de vérifier si l'anticorps obtenu contre la L-isoaspartyl méthyltransférase d'*Arabidopsis thaliana* reconnaissait également les enzymes orthologues d'autres espèces végétales, et si l'IAMT constituait également chez ces espèces un marqueur de l'aptitude à la germination.

Deux espèces d'intérêt agronomique ont été choisies pour ces expérimentations : le maïs (monocotylédone) et le haricot (dicotylédone).

Les graines de maïs (récoltes 1996, 1999, 2000 et 2001) et les graines de haricot (récoltes 2000 = lot 178 et 2001 = lot 197) sont d'abord sur-séchées à 20% HR (~ 28°C) en étuve ventilée. Pour déterminer la teneur en eau, 10 g de graines sont grossièrement broyées et pesés avant d'être chauffés à sec (130°C, 1 heure). La poudre de graines est refroidie sous vide et repesée (la précision est au dix millième de gramme). On peut ensuite estimer la teneur en eau initiale des graines après surséchage selon la formule :

$$\frac{M_i - M_f}{M_i} = TE_i$$

M_i = masse de graines avant chauffage
 M_f = masse de graines après chauffage
 TE_i = teneur en eau initiale

Dans les conditions utilisées, la teneur en eau finale du maïs est calculée à 11.28% et celle des 2 lots de haricot est calculée à 9.35% pour le lot et 11.51% pour le lot.

Afin de déterminer la masse d'eau à ajouter à une masse de graines connue pour fixer sa teneur en eau à la valeur souhaitée, on utilise la formule suivante :

$$\frac{M_1(TE_i - TE_f)}{TE_f - 1} = M_2$$

TE_i = teneur en eau initiale
 TE_f = teneur en eau finale
 M_1 = masse de graines
 M_2 = masse d'eau finale

Les graines sont placées dans un récipient étanche contenant le volume d'eau calculé. L'imbibition est réalisée pendant 3 jours sous agitation.

Vieillissement chez le maïs :

Dans les conditions de conservation classique, les lots de semences de maïs récoltés en 2001 et 2000 germent à 100 %, le lot de semences récolté en 1999 germe à 96 % et le lot de semences récolté en 1996 germe à 75 %.

Afin de réaliser la dégradation contrôlée du maïs, la teneur en eau de la graine est fixée à 17%. Le vieillissement est conduit à 45°C. Un échantillon est prélevé au bout de 1, 3 et 5 jours de vieillissement et un test de germination est effectué sur 200 graines.

5 Dans ces conditions, on obtient une incapacité totale à germer en 5 jours, comme le montre la Figure 6A.

Légende de la Figure 6A : Pourcentage de germination en fonction de la durée de la dégradation contrôlée.

Les protéines sont extraites des graines sèches issues des récoltes de 1996, 1999, 10 2000, et 2001, et non vieilles artificiellement, ainsi que des graines récoltées en 2001 vieilles artificiellement, et analysées en transfert de Western en utilisant l'anticorps 1, comme décrit à l'Exemple 4 ci-dessus. Les résultats apparaissent sur la Figure 6B.

Légende de la Figure 6B : 96, 99, 00, 01 : année de récolte ; (T1), (T3), (T5) jours : 1, 3, et 5 jours de vieillissement.

15 On observe 2 protéines de poids moléculaires 40 kDa et 55 kDa reconnues par l'anticorps 1. Ces protéines ne sont pas détectables dans les graines récoltées en 1996, pour lesquelles le pourcentage de germination, mesuré parallèlement, est de 75%. La teneur en protéine de 40 kDa est maximale dans les graines issues de la récolte de 2001, puis elle décroît ensuite avec l'âge de la récolte. 20 Dans les grains de 1999, elle est à peine détectable, alors que le pourcentage de germination de ces graines, est encore de 96%. La teneur en protéine de 55 kDa demeure au contraire relativement stable entre les récoltes de 1999 et de 2001.

En vieillissement accéléré, la quantité de protéine de 55 kDa demeure stable pendant le premier jour de vieillissement accéléré, puis elle n'est plus 25 détectable. La protéine de 40 kDa n'est plus détectable dès le premier jour de vieillissement accéléré..

Il apparaît donc que la disparition des protéines de 40 et 55 kDa reconnues par les anticorps anti-IAMT précède le déclin de la capacité germinative. Ces protéines, et notamment la protéine de 40 kDa sont donc utilisables en tant que 30 marqueur prédictif de vieillissement du grain.

Vieillissement chez le haricot :

2 lots de semences de haricot sont équilibrés à 16% de teneur en eau et placés en bocaux hermétiques à 40°C. Un échantillon est prélevé au bout de 3, 7, 11 et 14 jours de vieillissement et un test de germination est effectué sur 50 graines.

35 Les résultats sont illustrés par la Figure 7A.

Légende de la Figure 7A : Faculté germinative, exprimée pour 100 graines, en fonction de la durée de la dégradation contrôlée.

◇ : lot 197

■ : lot 178

- 5 Ces résultats montrent que les 2 lots ne se comportent pas de la même manière dans des conditions semblables de dégradation puisque le lot 178 (récolte de 2000) atteint 45% de germination au terme de 3 jours de vieillissement alors que ce pourcentage de germination est atteint en 9 jours pour le lot 197 (récolte de 2001).

- 10 Les protéines issues des graines sèches de haricot, provenant des récoltes de 2000 et de 2001, ainsi que des graines vieillies artificiellement à partir de ces 2 récoltes, ont également été caractérisées en Western blot à l'aide de l'anticorps 1.

Les résultats sont illustrés par la Figure 7B.

- 15 Légende de la Figure 7B : 178 (récolte de 2000) ; 197 (récolte de 2001) ; (T3), (T7), (T11) jours : 3, 7, et 11 jours de vieillissement.

- 20 L'anticorps 1 met en évidence 2 ou 3 protéines d'une taille d'environ 46 kDa. On observe que le lot 197, qui présente une meilleure aptitude à la conservation en vieillissement accéléré que le lot 178, contient une plus importante quantité de protéines reconnues par l'anticorps 1. En vieillissement accéléré, le lot 197 (récolte 2001) montre une baisse de la concentration de cet ensemble de protéines pour les temps de vieillissement qui précède la perte de viabilité. Le lot 178 (récolte 2000), dont la capacité germinative a chuté dès le 3^{ème} jour de vieillissement, ne présente pas de diminution sensible de la quantité de protéines reconnues par l'anticorps 1.

- 25 Ces résultats montrent qu'un anticorps anti-IAMT conforme à l'invention permet de mettre en évidence des différences d'aptitude à la conservation entre lots de semences, aussi bien dans des conditions de conservation naturelle, telles que celles utilisées par les semenciers, qu'en situation de détérioration contrôlée.

REVENDECATIONS

1) Procédé de détermination de la vigueur germinative et/ou de l'aptitude d'un lot de semences à la conservation, caractérisé en ce qu'il comprend la quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase, sur un échantillon de semences prélevé sur ledit lot.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase est effectuée à l'aide d'un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase.

3) Anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide constitué par tout ou partie de la portion de ladite enzyme définie par la séquence peptidique (I) suivante : QX₁LX₂VX₃DKX₄X₅DGSX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂SVRYVPLTSRX₁₃X₁₄QLX₁₅X₁₆X₁₇(SEQ ID NO :1), dans laquelle X₁ représente D ou E, X₂ représente Q ou K, X₃ représente V ou I, X₄ représente N ou S, X₅ représente S, E, ou A, X₆ représente soit un dipeptide choisi parmi VS, VT, et TS, soit une liaison peptidique, X₇ représente I ou V, X₈ représente K, Q ou R, X₉ représente D, V ou N, X₁₀ représente soit le dipeptide HT, soit une liaison peptidique, X₁₁ représente E ou D, X₁₂ représente T ou A, X₁₃ représente E, V ou S, X₁₄ représente A ou E, X₁₅ représente R, G ou Q, X₁₆ représente G ou D, X₁₇ représente D ou F.

4) Anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide choisi parmi :

(i) un peptide de séquence (II) : QX₁LX₂VX₃DKX₄X₅DGSX₆X₇X₈ (SEQ ID NO :2), dans laquelle X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇ et X₈ sont tels que définis dans la revendication 3 ;

(ii) un peptide de séquence (III) : RYVPLTSRX₁₃X₁₄QLX₁₅ (SEQ ID NO :3), dans laquelle X₁₃, X₁₄ et X₁₅, sont tels que définis dans la revendication 3.

5) Anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un peptide choisi parmi :

(i) un peptide de séquence QDLQVVDKNSDGSVSIK (SEQ ID NO :4);

(ii) un peptide de séquence RYVPLTSREAQLR (SEQ ID NO :5).

6) Procédé de quantification de la L-isoaspartyl méthyltransférase dans du matériel végétal, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact dudit matériel avec un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase selon l'une quelconque des revendications 3 à 5.

7) Utilisation d'un anticorps anti-L-isoaspartyl méthyltransférase selon l'une quelconque des revendications 3 à 5 pour déterminer la vigueur germinative et/ou l'aptitude à la conservation d'un lot de semences.

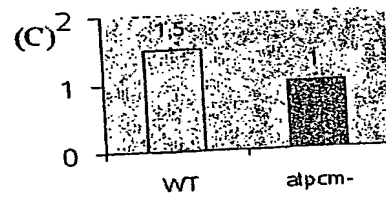
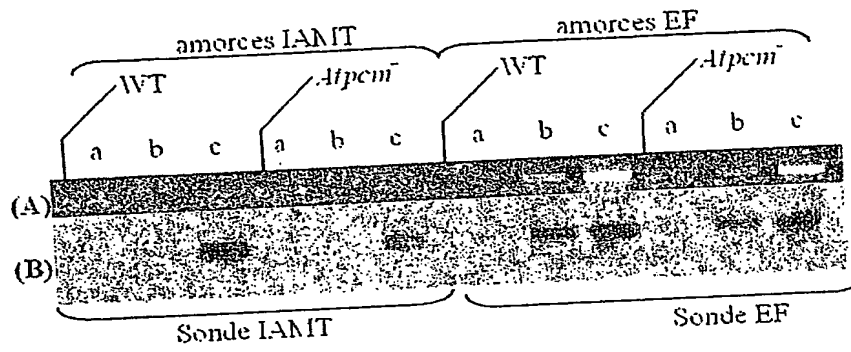


FIG 1

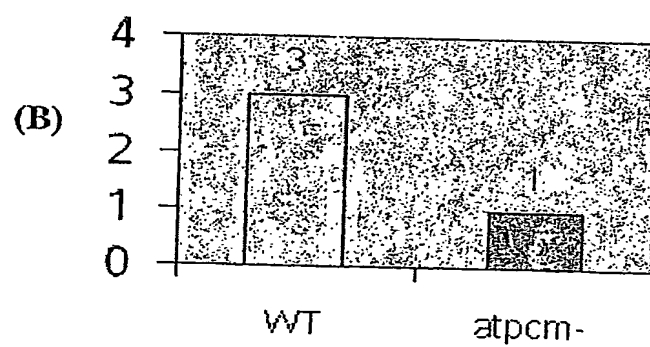
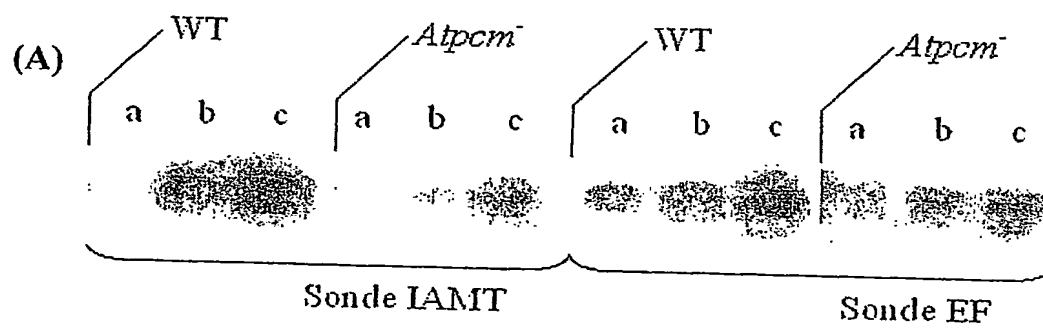


FIG 2

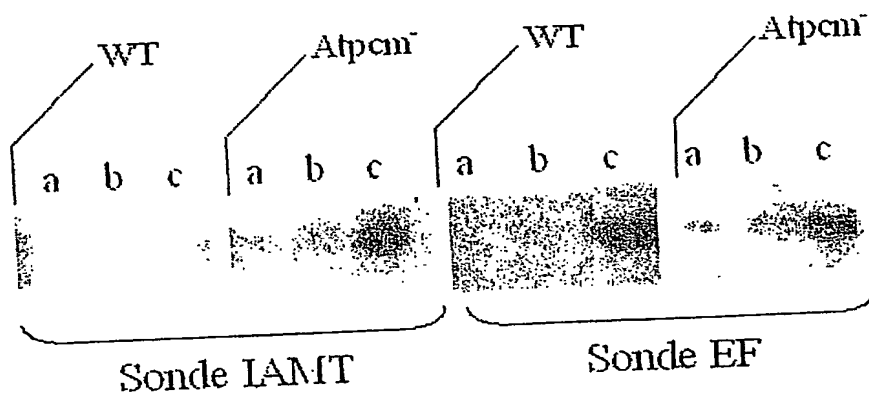
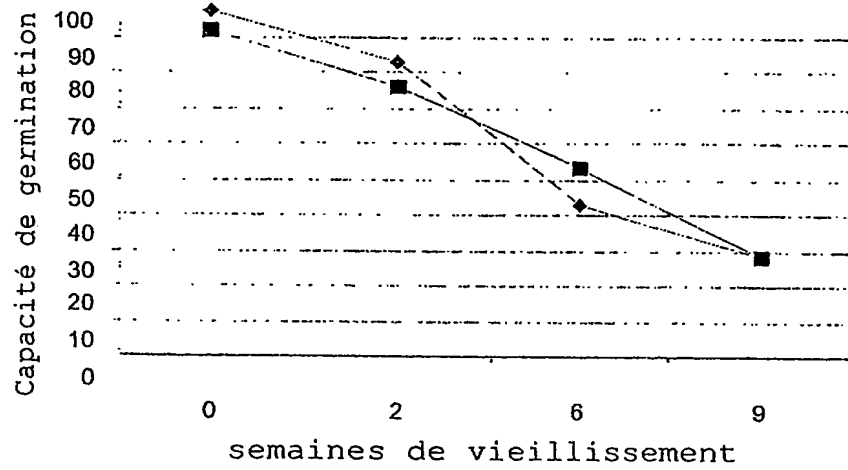


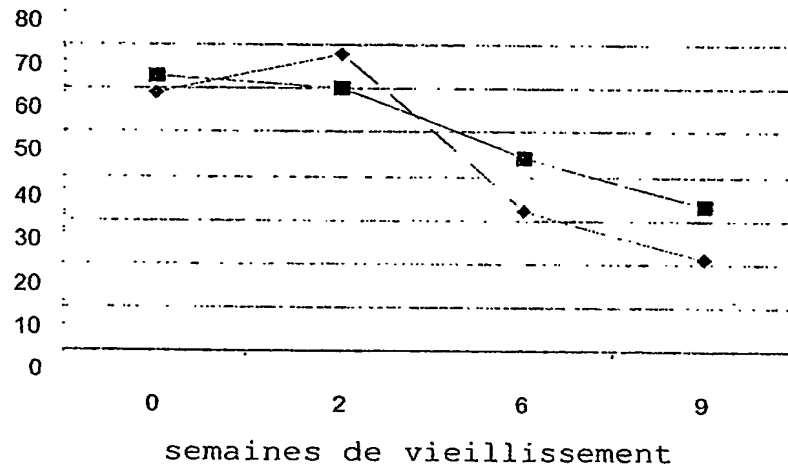
FIG 3

(A)

4/7



(B)



(C)

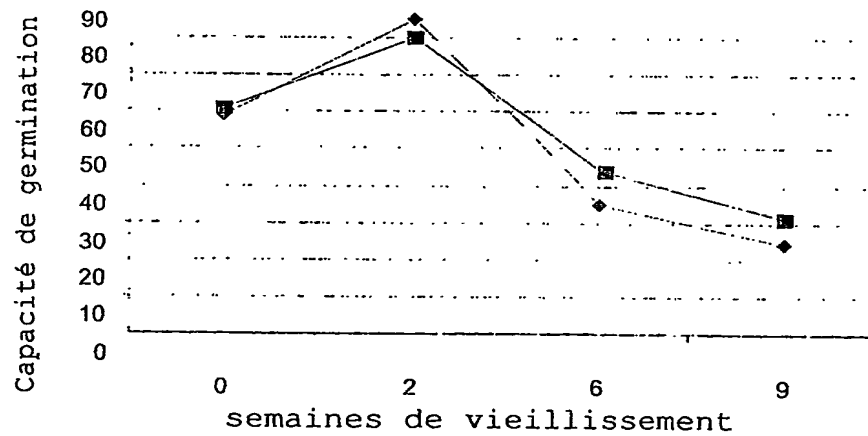


FIG 4

WT WT₂ WT₆ WT₉ MT MT₂ MT₆ MT₉

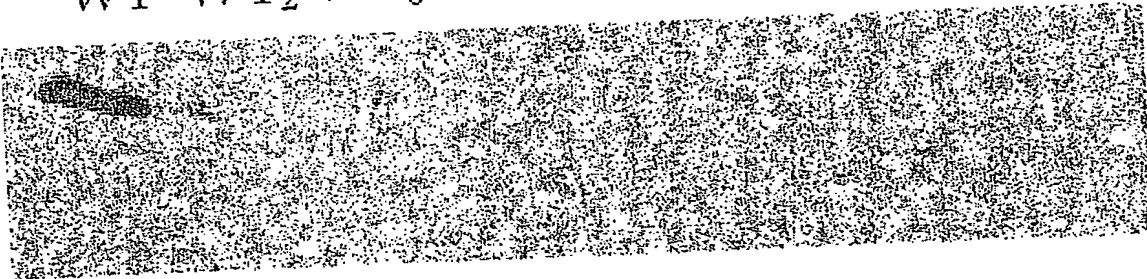
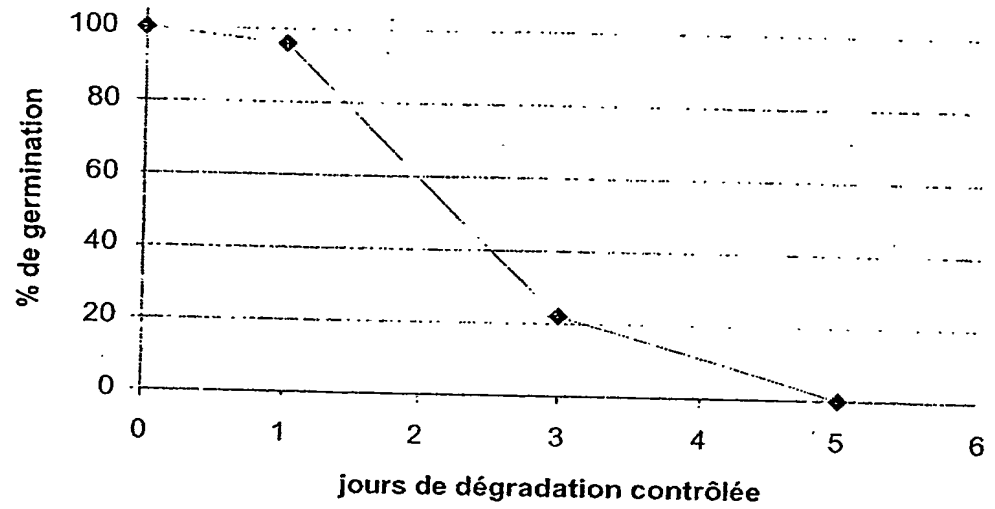


FIG 5

6/7

(A)



(B)

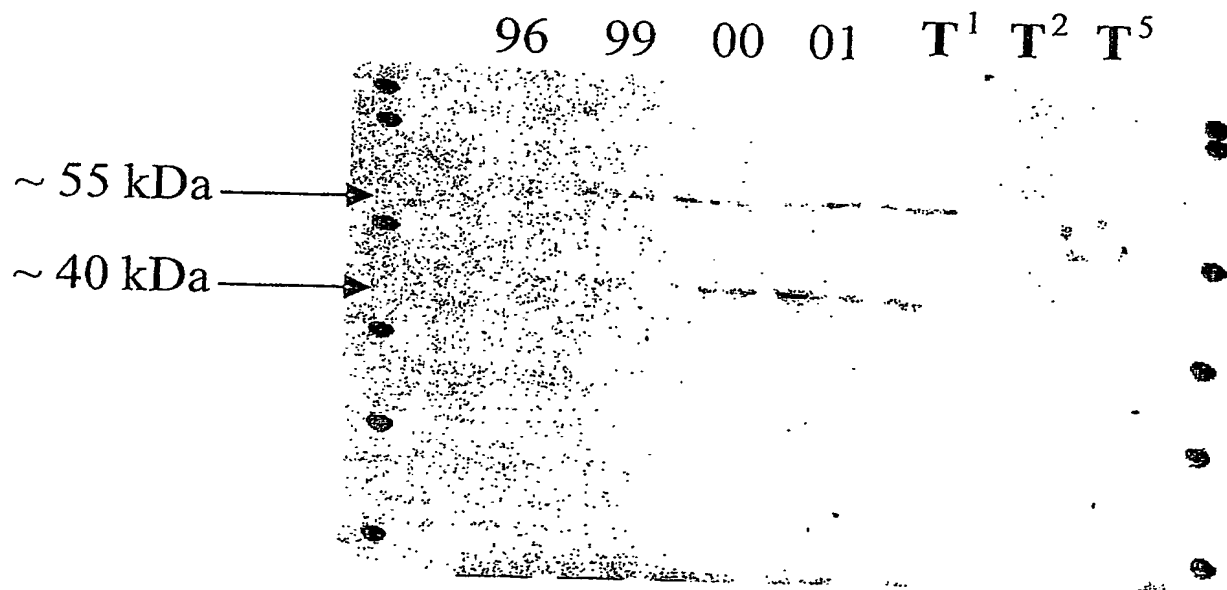


FIG 6

7/7

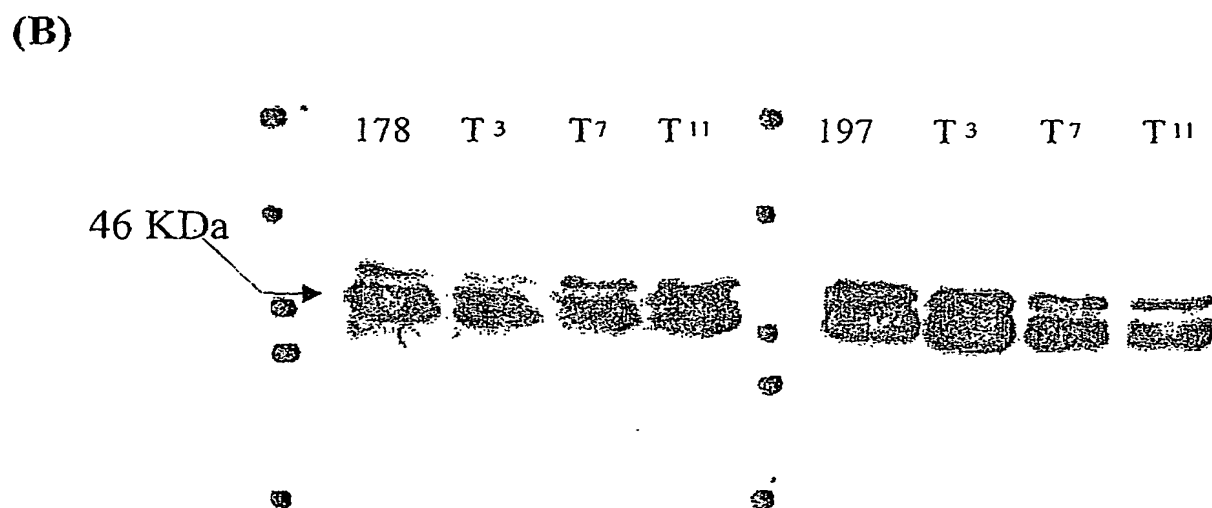
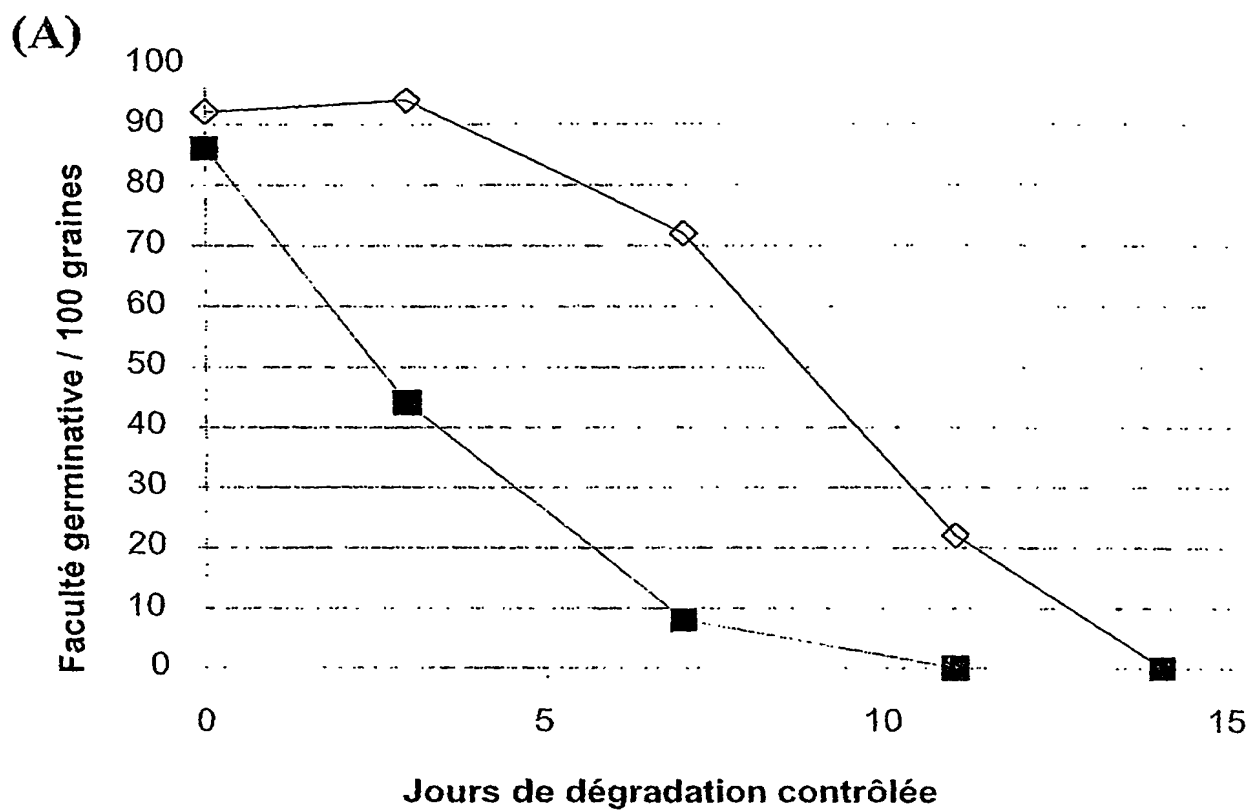


FIG 7

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

<120> UTILISATION DE LA L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE COMME MARQUEUR DE
LONGEVITE DES SEMENCES

<130> MJPbv539/118

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Séquence consensus L-isoaspartyl méthyltransférases végétales

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X= D ou E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X= Q ou K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X= V ou I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)
<223> X= N ou S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X=S, E ou A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X=VS, VT, TS ou liaison peptidique

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X= I ou V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X= K, Q ou R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X= D, V ou N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X= HT ou liaison peptidique

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X= E ou D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> X= T ou A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> X=E, V ou S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> X=A ou E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> X=R, G ou Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X=G ou D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> X=D ou F

<400> 1

Gln Xaa Leu Xaa Val Xaa Asp Lys Xaa Xaa Asp Gly Ser Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Val Arg Tyr Val Pro Leu Thr Ser Arg Xaa Xaa
 20 25 30

Gln Leu Xaa Xaa Xaa

35

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Séquence consensus L-isoaspartyl méthyltransférases végétales

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X= D ou E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X= Q ou K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X= V ou I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X= N ou S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X= S, E ou A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> X= VS, VT, TS ou une liaison peptidique

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> X= I ou V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X= K, Q ou R

<400> 2

Gln	Xaa	Leu	Xaa	Val	Xaa	Asp	Lys	Xaa	Xaa	Asp	Gly	Ser	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10						15	

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Séquence consensus L-isoaspartyl méthyltransférases végétales

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X= E, V ou S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X= A ou E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X= R, G ou Q

<400> 3

Arg Tyr Val Pro Leu Thr Ser Arg Xaa Xaa Gln Leu Xaa
1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> peptide immunogène

<400> 4

Gln Asp Leu Gln Val Val Asp Lys Asn Ser Asp Gly Ser Val Ser Ile
1 5 10 15

Lys

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> peptide immunogène

<400> 5

Arg Tyr Val Pro Leu Thr Ser Arg Glu Ala Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 6
gctatggagg ctgtggatag agg

23

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 7
tcagtcccct ctcagctgcg c

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 8
ggaccgggta cttaactgct t

21

<210> 9
<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 9

ttggcggcac ccttagctgg atca

24

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 10

atgccccagg acatcgtgat ttcac

25

reçue le 05/01/04



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601



Vos références pour ce dossier (facultatif)

MJP/bv539/118

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0313888

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

UTILISATION DE LA L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE COMME MARQUEUR DE LONGEVITE DES SEMENCES.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
147, rue de l'Université
75007 PARIS

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1	Nom	GRAPPIN
	Prénoms	Philippe
Adresse	Rue	45 rue Victor Hugo
	Code postal et ville	1718171310 PLAISIR
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	OGE
	Prénoms	Laurent
Adresse	Rue	3 place Paul Verlaine
	Code postal et ville	191211010 BOULOGNE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	BOVE
	Prénoms	Jérôme
Adresse	Rue	20 route de Brenelle
	Code postal et ville	10121210 BRAINE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

~~DU (DES) DEMANDEUR(S)~~

~~OU~~ DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

VIALLE-PRESLES Marie José
(n° 93-2009)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.